



TITLE:

内在性抗オピオイド物質のウシ脳
組織からの精製、同定とその薬理
活性に関する研究(Dissertation_全
文)

AUTHOR(S):

金子, 周司

CITATION:

金子, 周司. 内在性抗オピオイド物質のウシ脳組織からの精製、同定と
その薬理活性に関する研究. 京都大学, 1985, 薬学博士

ISSUE DATE:

1985-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3282>

RIGHT:

新	制
薬	
117	

京大附図

内在性抗オピオイド物質の ウシ脳組織からの精製、同定と その薬理活性に関する研究

1985

金子周司

内在性抗オピオイド物質の
ウシ脳組織からの精製、同定と
その薬理活性に関する研究

1985

金子周司

目 次

緒 言	1
第 1 編 内在性抗オピオイド物質のウシ脳組織からの精製と同定	4
第 1 章 抗オピオイド活性のスクリーニング法	5
第 2 章 内在性抗オピオイド物質の精製	7
第 3 章 peak B 由来, 単離ペプチドのアミノ酸分析	15
3-1 アミノ酸分析	15
3-2 N 末端分析	16
第 4 章 活性物質が angiotensin I および II であることの同定	17
第 1 編の考察	20
小 括	22
第 2 編 Angiotensin の抗オピオイド作用	23
第 1 章 脳組織オピオイドレセプターに対する作用	24
第 2 章 モルモット摘出回腸縦走筋における抗オピオイド作用	26
2-1 抗 Met-enkephalin 活性の定量的評価	26
2-2 抗オピオイド作用の本体	28
2-3 Angiotensin II の作用機序	29

第 3 章	マウスおよびウサギ摘出輸精管における抗オピオイド作用	33
第 4 章	マウス脳室内投与による morphine 鎮痛減弱作用	35
第 2 編の考察	41
小 括	42
結 論	44
謝 辞	45
引用文献	46

緒 言

内在性『抗オピオイド物質』，換言すれば生体内で合成され，オピオイドの作用に相反する効果を示す物質，という新たなカテゴリーに属する生理活性物質が脳内に存在する可能性は，近年になって海外の研究者らにより示唆されたものである。

まず Ungar ら (1977) は，マウス摘出輸精管検定法および鎮痛検定法を指標にして，ラット脳抽出物中にオピオイドの作用を減弱させる画分があることを見出し，初めて "endogenous opioid antagonists" という言葉を使用した。しかし彼らがその推定上の物質として合成した Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met は，opioid agonist としては作用したが，拮抗作用を示さなかった。続いて Han ら (1979) は，やはりマウス摘出輸精管検定法および鎮痛検定法を指標にして，acupuncture 耐性ラットの脳から，さらに Wahlström と Terenius (1980) は，モルモット摘出回腸検定法を指標にして，ヒト脳脊髄液から，それぞれ新たにオピオイドの作用を減弱させる画分を部分精製したが，いずれの報告も，それらの活性物質を単離するには至らずに終わっており，従って，化学構造も決定されていない。

これらの報告に共通して論じられているのは，内在性抗オピオイド物質がオピオイドの耐性現象に密接に関与している可能性である。オピオイド，特に古くから強力な鎮痛薬として用いられている morphine は，連用により強い耐性と身体依存性を形成することが知られているが，その形成機序については諸説があり，未だ結論には至っていない (金戸，1981)。彼らはいずれも，このオピオイド耐性は，内在性抗オピオイド物質の増加，ないしは活性化によりオピオイドの鎮痛効果が相対的に減弱することに起因するという興味ある推論をしたが，その物質が確認されていないために，そのような仮説の真偽は確認されないままになっている。

一方，これらの報告とは別に，既知の神経ペプチドと，そのフラグメントの中にもオピオイド鎮痛を減弱する作用を示すものが，いくつか報告されている。特にその中で，以前から内在性抗オピオイド物質としての可能性を追究されたものに，melanotropin release inhibiting factor (MIF) がある。MIF は，oxytocin の C 末端構造 (oxytocin₇₋₉; Pro-Leu-Gly-NH₂) をもつ視床下部ペプチドであるが，Kastin ら (1979) は，全身性に投与した MIF が morphine 鎮痛を減弱させることを報告した。しかし慢性 morphine 投与による耐性発現に及ぼす MIF の影響については，抑制が報告された例 (Walter ら，1979; Bhargava，1981; Slater と Dickinson，1981) と，逆に増強が報告された例 (van Ree と de Wied，1976;

Székely ら, 1979) があり, 最終的に一致した見解は得られていない状態である。

他に抗オピオイド作用が報告されている例としては, ACTH フラグメント (Terenius, 1975; Smock と Fields, 1981) や β -endorphin フラグメント (Lee ら, 1980; Hammonds ら, 1984) のような preproopiomelanocortin から派生するペプチドがある。しかし実際に, これらのフラグメントが生理活性物質として生体内で機能しているのかどうかは不明である。

さらにごく最近, 抗オピオイド物質とし注目されているのが, cholecystokinin octapeptide (CCK-8) である。CCK-8 は全身性投与および脳内投与により, オピオイド鎮痛を減弱させることが報告されている (Itoh ら, 1982; Faris ら, 1983; Tang ら, 1984) が, 一方, 投与量によっては逆に鎮痛を引き起こすことも知られている (Zetler, 1979)。また, morphine 耐性形成に対しては無影響であるという報告 (Faris ら, 1984) もあり, これらの機序については未解決な点が多い (Magnani ら, 1984)。

以上の報告に見られるように, 内在性抗オピオイド物質に関する研究は注目されつつあるが, まだ着手したばかりの断片的な報告が多く, これまで実際に生体内から抗オピオイド物質を単離し, その構造決定から薬理作用にまで及ぶ, 系統的な一連の研究は例を見ない。一方, 過去に当研究室において, ウシ脳組織から新鎮痛ペプチド kyotorphin (Takagi ら, 1979), および neo-kyotorphin (Fukui ら, 1983) が単離されたが, 著者は, それらの精製途中で得られた画分のうちのひとつに, モルモット摘出回腸縦走筋標本に対して抗オピオイド活性を示す画分を予試験中に見い出した。そこで著者は新たなウシ脳組織を原料にして, モルモット摘出回腸縦走筋標本に対する抗オピオイド活性を指標に, 未知の内在性抗オピオイド物質を単離し, その薬理作用を明らかにしようとした。その結果, 次のような新知見を得た。

1. 100 頭分のウシ脳組織から, その中にごく微量含まれていた 2 つの抗オピオイド物質を単離し, それらが意外にも angiotensin I および II であることを解明した。
2. モルモット摘出回腸縦走筋検定法において, angiotensin I および II は合成麻薬拮抗薬である naloxone の約 100 倍強力な抗オピオイド作用を有することを明らかにした。また, これらの作用機序は, 活性発現型である angiotensin II が angiotensin II レセプターに作用し, ACh 遊離を促進させることにより起こるものであることを解明し, これらが生理的な抗オピオイド物質として働いていることを示唆した。
3. マウス脳室内に投与された angiotensin II は, それ自体では痛覚反応性に影響を及ぼさないが, きわめて低用量で用量依存的に morphine 鎮痛を減弱させることを明らかにした。

以上の知見より, angiotensin II は新たに強力な内在性抗オピオイド物質として評価し得る
との結論に達した。

以下, これらの知見について2編に分けて論述する。

なお, 本文中あるいは図表中で使用した略号は次の通りである。

本文中

ACh : acetylcholine

GPI : モルモット摘出回腸縦走筋検定法

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

図表中

AGT : angiotensin

ME : Met-enkephalin

NLX : naloxone

n : 実験例数

第 1 編

内在性抗オピオイド物質の ウシ脳組織からの精製と同定

著者が本研究に着手した発端は、先の緒言でも触れたように、予試験の際に、ウシ脳抽出物中にモルモット回腸縦走筋標本に対して抗オピオイド作用を有する画分を見い出したことに始まる。また、この画分はゲル濾過での溶出位置から分子量が 1000 ないし 1800 と推定され、さらに trypsin 消化によって活性が消失したことからペプチドであることが予想されていた。この予試験にあたってはウシ 30 頭分の脳組織を原料としたが、実際に精製してみると活性が強力な反面、きわめて微量であることがしだいに判明し、その上驚いたことに、精製するに従ってガラス壁あるいはクロマト担体樹脂等に対する非特異的吸着が起こり、単離には成功しても、構造決定に十分な量を得ることができなかった。

近年、精製技術の進歩や分析機器の発達により、脳内からの未知の生理活性ペプチドの精製はますます微量化しつつある（奥山と笠川，1981）。そして、脳内から未知の微量な生理活性ペプチドを精製するに当たって配慮あるいは克服しなければならない問題点は、これまでに多くの報告や総説の中で述べられてきた。（Ho ら，1980；橘，1981；松尾と寒川，1984）。これらを要約すると次の 4 点にまとめられると思われる。

- (1) スクリーニング法の問題 — どの程度目的とする生理活性物質に対して特異的かつ高感度で簡便な生理活性検定法を用いることができるか。
- (2) 原材料の選択と確保の問題 — 必要十分な収量を得るために、どのような原材料を選び、どれだけの必要とするのか。
- (3) 内因性プロテアーゼの影響の問題 — 目的とするペプチドが分解したり、大分子タンパクから artifact が発生するのを防ぐために、抽出や精製時にいかにして内因性プロテアーゼを排除するのか。
- (4) 回収率の問題 — 生理活性ペプチドの中には吸着、失活などにより、精製方法によってはかなりの損失が起こることがあるため、どのような精製手段を用いるのか。

このような問題点は、本研究に際しても直面した問題であり、以下の内在性抗オピオイド物質の精製過程については、これらの問題点と関連しつつ論述する。

第1章 抗オピオイド活性のスクリーニング法

モルモット摘出回腸縦走筋検定法 (GPI) は、オピオイドの効力試験法として簡便であり、かつ広く用いられている生物検定法である。これまでに脳内から単離されたオピオイドペプチドも、GPIにおける活性を指標にして精製されたものが数多い (Hughes, 1985 ; Goldstein ら, 1979 など)。

本研究においても、これらオピオイドに相反する作用を示す物質を探索するために、スクリーニング法として若干の改良、工夫を加えたGPIを用いて、抗オピオイド活性の評価を行った。

<実験方法>

実験には250ないし400gの雄性モルモットを用い、摘出回腸標本はKosterlitzら(1970)の方法に従って作成した。標本を懸垂するbathの容量としては、検定に要する試料の量を最少に抑え、高感度を得るために1.5mlとした。栄養液としてはKrebs液 (NaCl 118mM, KCl 4.75mM, CaCl₂ 2.54mM, MgSO₄ 1.2mM, KH₂PO₄ 1.19mM, NaHCO₃ 25mM, glucose 11mM)を用い、液温は37℃とした。bath内へは1/5ゲージのカテラン針によって、95% O₂-5% CO₂混合ガスを適度に通気した。標本に対しては、0.5gの一定負荷張力をかけ、bath中に標本をはさんで15mm間隔で同軸性に設置した2つの白金リング (5mm径) から0.1 Hz, 100V, 0.5-1.0 msecの矩形波で電場刺激を与え、刺激に応じて誘発される攣縮を、等尺性トランスデューサーを介して記録した。

対照薬となるオピオイドとしては、吸着性が弱く、標本の洗浄を繰り返しても再現性の良い攣縮抑制が用量依存的に得られる内在性オピオイドペプチドとして、Met-enkephalinを用いた。また、試料はMet-enkephalin投与後、3-5分に投与し、その投与液量は、溶媒自体が攣縮に影響を及ぼさないように、50μlを上限とした。

<実験結果および考察>

図1にはGPIにおけるMet-enkephalinの攣縮抑制作用と、その3分後にnaloxoneを投与した時に観察される回復の一例を示した。それぞれの薬物濃度はbath中での濃度で表わした。ここで、naloxoneの拮抗作用は、 10^{-7} M (bath中濃度) \times 1.5ml (bath容積) = 1.5×10^{-10} mol (一回投与量) という微量で著明に検出され、GPIが未知の抗オピオイド物質に対しても、

高感度な検出能力を示すことが予想された。しかし、実際のスクリーニングにあたっては、精製画分中に含まれる微量の無機塩や有機溶媒が攣縮に影響を及ぼしたため、試料は常に脱塩などの処置後に適用するように留意した。なお、Met-enkephalin の 50 % 攣縮抑制濃度 (IC_{50}) は、およそ $5 \times 10^{-8} M$ であり、以後のスクリーニングには通常 $5 \times 10^{-8} M$ の Met-enkephalin を対照に用いた。

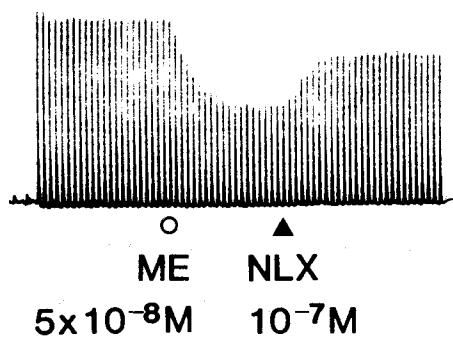


図 1. GPI における naloxone の
抗 Met-enkephalin 作用

第2章 内在性抗オピオイド物質の精製

表1に抽出・分離操作の概要を示した。右の括弧内には、得られた2つの抗オピオイド物質のうち、最終的に活性画分の全量を単離した1つの物質について、各段階で得られた画分の重量、あるいは、無機塩を大量に含んだ画分についてはLowryら(1951)の方法により求めたタンパク量を記した。

以下、これらの精製過程の実験方法、実験結果および考察について詳述する。

表1. ウシ脳からの内在性抗オピオイド物質の精製過程

	100 bovine brains	(40kg)
STEP 1	acetone powder	(7.5kg)
STEP 2	1M CH ₃ COOH・20mM HCl extract (4°C)	(750g)
STEP 3	SP-Sephadex C-25 batch	pH3.5-pH9.0 fraction (192g)
STEP 4	Sephadex G-25	Vo x 1.6-2.2 fraction (46g)
STEP 5	CM-Sephadex C-25 gradient	peak B (2.1g)
STEP 6	Bio-Gel P-2	Vo x 2.0-2.3 fraction (200mg)
STEP 7	Sephadex G-15	Vo x 1.2-1.6 fraction (117mg)
STEP 8	Cosmosil 5CN-R Pi/CH ₃ CN gradient	(5mg)
STEP 9	Cosmosil 5C18 TFA/CH ₃ CN gradient	
STEP 10	Cosmosil 5C18 Pi/CH ₃ CN gradient	
	pure peptide	(10nmol・10μg)

Vo : void volume

Pi : phosphate buffer

TFA : trifluoroacetic acid

STEP 1 原料とアセトン粉末の作成

予試験によって、1頭分のウシ全脳から得ることのできる2つの抗オピオイド物質は、それぞれわずか1nmol以下であると予想されていた。現在の発達した分析技術によって、近年では約10nmolの単離ペプチドからその構造決定が可能であると言われている。従って今回の精製にあたっては、スクリーニングを各段階ごとに繰り返すことによる損失を見込んで、必要最少限の収量を得るために、100頭のウシから重量にして40kgという大量の脳組織を必要とした。

ウシ脳組織は次のように処理した。

屠殺場にて屠殺後 30 分以内に得たウシ全脳から小脳を取り除き、ただちに氷冷した生理食塩水中で軟膜、血液を可能な限り除去した。続いて細かな断片に分け、 -80°C のドライアイス-アセトン混液中で急速に凍結させ実験室に持ち帰った。次にこの凍結組織成分から水分と脂質を除去するために、 -10°C に保ちながらアセトンとともにポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、吸引濾過により残渣を得る操作を 3 回繰り返し、微細な乾燥アセトン粉末 (7.5 kg) を得た。アセトン粉末は -20°C で保存し、10 日以内に次の処置を行った。

STEP 2 酸抽出

先に述べたように、抽出時に最も問題となるのは、いかにして内因性プロテアーゼによる二次的分解を抑制し、かつ最大の抽出効率をあげるか、ということである。

まず予試験により、目的とする抗オピオイド物質は弱塩基性のペプチドであることがわかっていった。そこで内因性プロテアーゼ活性を抑えながら、効率よく抽出するために、アセトン粉末を 7 倍量の 1M 酢酸-20 mM 塩酸混液 ($\text{pH} 1.9$) とともに 4°C で 18 時間かくはんし、10,000 rpm、30 分の遠心分離により得られた上清を抽出液とした。また残渣から同様にしてもういちど抽出操作を行い、先の抽出液と合わせた。得られた抽出液は $\text{pH} 3$ 以下であった。

ところで近年、脳内ペプチドの精製には、内因性プロテアーゼをすみやかに変性、失活させ、続く精製操作中における二次的分解を防ぐ抽出法として、新鮮な組織をただちに酸とともに短時間煮沸する方法がしばしば用いられている (Kangawa ら, 1983)。そこで、先の抽出法と比較するため、別に新たな 1 頭分のウシ脳組織を先の組成の酸混液とともに 10 分間煮沸することにより抽出し、抗オピオイド活性画分を部分精製してみたところ、得られた 2 つの活性画分の量と存在比は、本研究のように低温で抽出した場合とほぼ等しかった。すなわち低温で抽出した場合でも、その後の精製過程を含めて、十分にプロテアーゼ活性を抑えることができたと考えられた。

STEP 3 SP-Sephadex C-25 バッチ法

先の低温抽出法により得られた抽出液を、ただちに NaOH 滴定によって $\text{pH} 3.5$ に調整し、予め $0.05 \text{ M} [\text{Na}^+] - \text{acetate}$ 緩衝液 ($\text{pH} 3.5$) 中で膨潤させた SP-Sephadex C-25 ゲルを抽出液 1 l に対して 500 ml の割合で加え、氷冷下で 1 時間ゆるやかにかくはんした。次に、ゲルに吸着した物質を取り出すために、ゲルのみを吸引濾過で残し、再び $0.05 \text{ M} [\text{Na}^+] - \text{acetate}$ 緩衝液を加え、氷冷下でゆるやかにかくはんしながら NaOH 滴定を行い、 $\text{pH} 9.0$ までに溶出

してくる画分を分取し凍結乾燥した。

STEP 4 Sephadex G-25 カラムによるゲル汙過

CM-Sephadex バッチ法で得られた画分を、次に Sephadex G-25 カラムによりゲル汙過した。図 2 には、STEP 3 生成画分のウシ脳約 25 頭分相当量 (50 g) をカラムに適用し、溶出液の 280nm における紫外吸収をモニターした結果を示した。この溶出液の一部を各試験管ごとに分取し、凍結乾燥したのちスクリーニングしたところ、void volume の約 1.6 倍から 2.2 倍の位置にわたって広く抗 Met-enkephalin 活性が検出された。

図 3 にその結果の一例を示したが、このように、先の図 1 に示した naloxone に比べるとややゆるやかではあるが、Met-enkephalin により抑制された攣縮を顕著に回復させる活性が認められた。以後の精製過程では、このような抗 Met-enkephalin 活性を指標とした。

なお、これ以降のカラム操作は 4℃で行った。

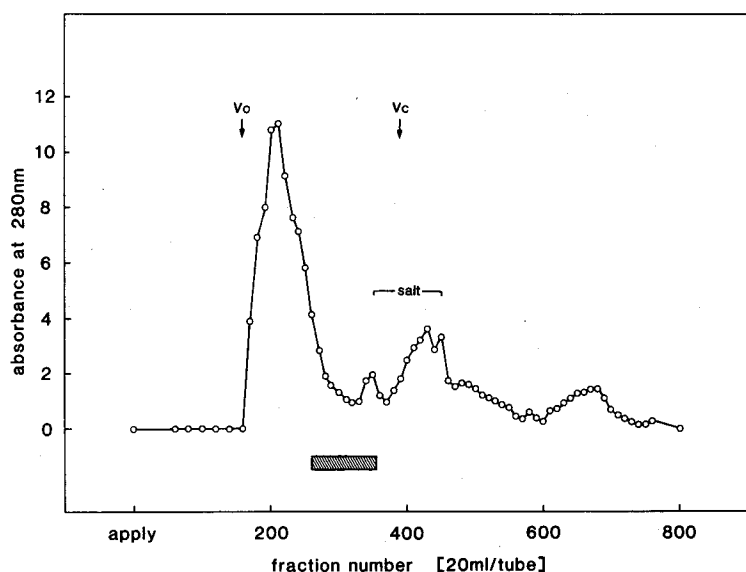


図 2. STEP 4: Sephadex G-25 (medium) カラムによるゲル汙過
カラム: 10 × 100 cm, 7850 ml
溶出液: 0.5% ギ酸-0.5% ピリジン混液
流速: 約 5 ml/min

Vo, Vc はそれぞれ void volume, 総カラム容積を示す。
salt は無機塩の溶出位置。GPI 抗オピオイド活性は斜線部に溶出した。

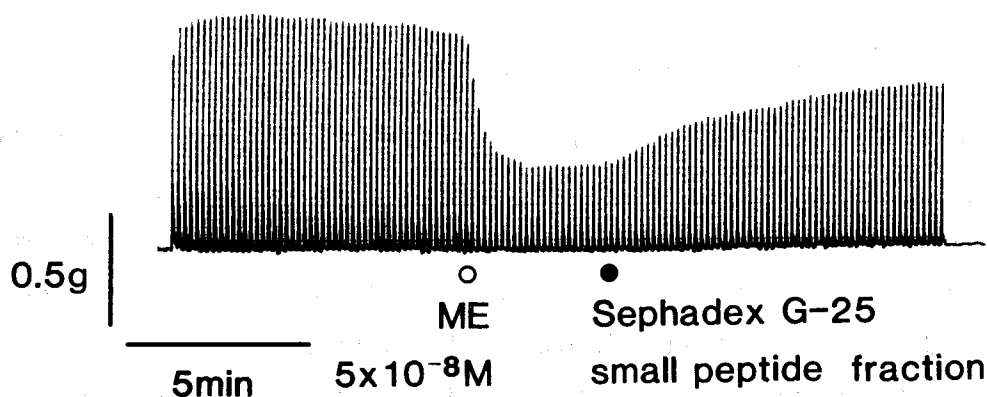


図3. Sephadex G-25 カラムより得られた画分に検出された抗 Met-enkephalin 活性

試料：活性画分の凍結乾燥物，約10mg

STEP 5 CM-Sephadex C-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィー

得られた活性画分を，次にCM-Sephadex C-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィーで分離した。図4には，先の活性画分の約50頭分相当量(23g)を緩衝液に溶解させてカラムに適用し，緩衝液でカラムを洗浄したのちに，0.75 M NaClを含む緩衝液に対して直線的濃度勾配をかけて溶出した結果を示した。緩衝液には特に5% n-propanolを加えたが，これはゲル，あるいはガラス壁に対する非特異的吸着を防ぎ，回収率を向上させるための処置である。抗 Met-enkephalin 活性は図5に示したように，2つのピークに分離して検出された (peak A, peak B)。これら2つの画分の活性は，定性的にきわめて類似していることが確認されたため，以下の精製は，まず総活性量の多かった peak B について行った。

STEP 6 Bio-Gel P-2 カラムによるゲル濾過

図5に，peak B 画分をBio-Gel P-2 (200-400 mesh)カラムによりゲル濾過した結果を示した。peak A, peak B 共に，Bio-Gel P-2 カラムでゲル濾過をすると，抗 Met-enkephalin 活性は担体（ポリアクリルアミド）との相互作用が原因と思われるが，大部分の混在物と分離して比較的遅い位置に溶出した (peak A で void volume の2.4-2.7倍，peak B で同じく2.0-2.3倍)。また，この結果からおそらく peak Aより peak B の方が分子サイズとして大きいことが予測された。

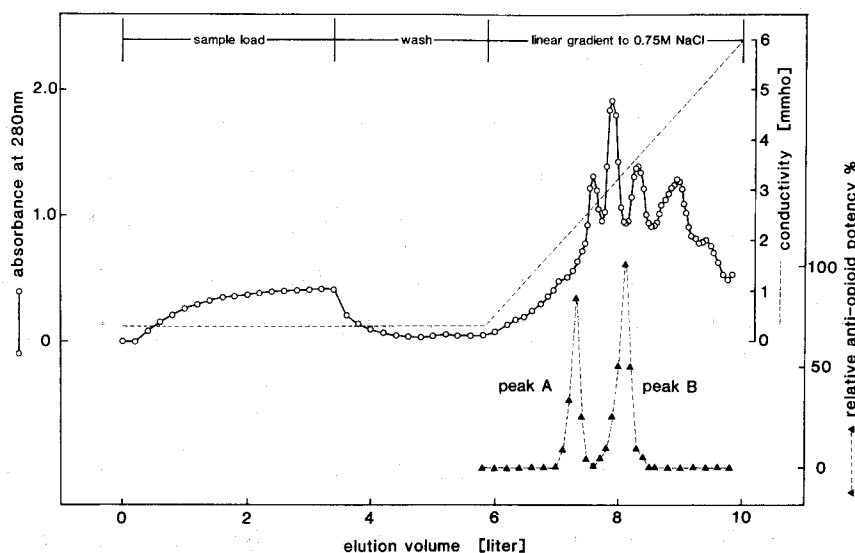


図4. STEP 5 : CM-Sephadex C-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィー
 カラム : 5×50 cm, 約 1000 ml
 緩衝液 : 5 % n-propanol 含有 0.05 M $[\text{Na}^+]$ -acetate 緩衝液 pH5.5
 流速 : 約 3.3 ml/min

抗 Met-enkephalin 活性は最大の画分を 100 として表わした。

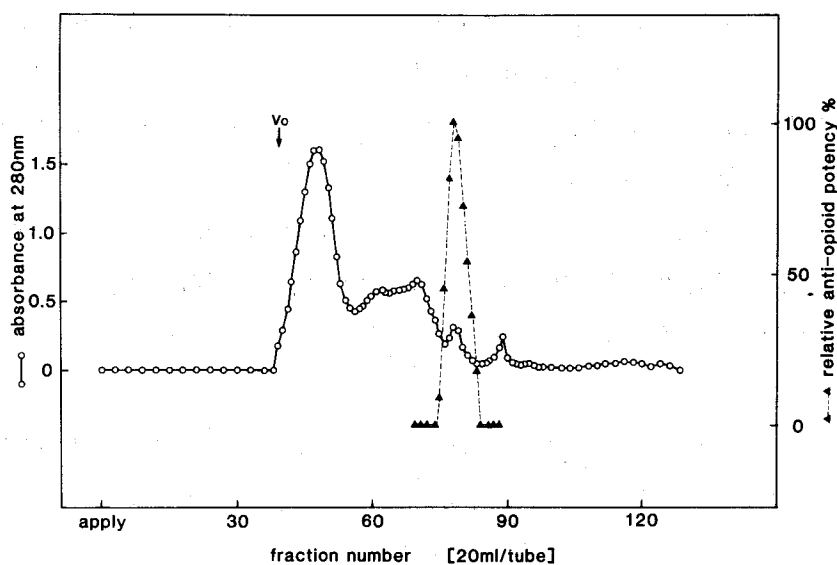


図5. STEP 6 : Bio-Gel P-2 200-400 mesh カラムによる peak B 画分の
 ゲル濾過
 カラム : 5.5×90 cm, 2100 ml
 溶出液 : 5 % n-propanol 含有 2.5 % ギ酸
 流速 : 95 ml/hr

STEP 7 Sephadex G-15 カラムによるゲル汙過

STEP 6 のゲル汙過では、活性画分が無機塩の溶出位置と一部重なったため、次の HPLC による精製の前処理として、Sephadex G-15 カラム (1.8×160 cm, 400 ml) により、活性画分の脱塩をした。溶出液には 30 % n-propanol を含む 3 % ギ酸を用い、流速は 8 ml / hr とした。peak A からの活性物質は void volume の約 1.3–1.7 倍に、peak B からの活性物質は同じく約 1.2–1.6 倍の位置に溶出され、それぞれ凍結乾燥により無機塩を含まない白色粉末になった。

STEP 8, 9, 10 逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による単離

以上の精製では、従来から使われていたゲル汙過とイオン交換クロマトグラフィーを用いてきたが、まだかなりの混在物が除けていない状態であった。そこで以下の精製は、その分離能が優れていることから、近年、ペプチドの精製に頻繁に用いられるようになった逆相系カラムによる HPLC で行った。カラムは半井化学より購入した Cosmosil 5CN-R カラム、及び Cosmosil 5C18 カラムを用い、GILSON 社の HPLC システムを使用し、溶出は acetonitrile 濃度勾配により行った。また、これらの操作は室温で行った。

図 6 左には、先に脱塩された peak B 由来の活性画分のウシ脳約 2.5 頭分相当量を適用した結果を、また、図 6 右には、そこから得られた抗 Met-enkephalin 活性画分のウシ脳約 20 頭分相当量を適用した結果を示した。図 6 右に見られるように、抗 Met-enkephalin 活性はほぼ紫外吸収ピークと一致して認められた。

なお、これらの活性画分は、シリコン・コートした試験管などに対してもかなり吸着する性質を示したため、試験管類は活性画分溶液を入れた後、必ず 0.1 規定塩酸–メタノール混液 (1 : 1) で吸着した活性物質を洗い出すように注意した。

図 7 には、peak B 由来の抗オピオイド物質の最終精製を示した。その結果、抗 Met-enkephalin 活性は鋭敏な紫外吸収ピークと完全に一致して認められた、また、この画分は先の STEP 8, あるいは STEP 9 のような別の条件の HPLC によっても単一ペプチドであることが確認された。なお、紫外吸収値からの推測から、このペプチドの収量はきわめて微量であると考えられた。

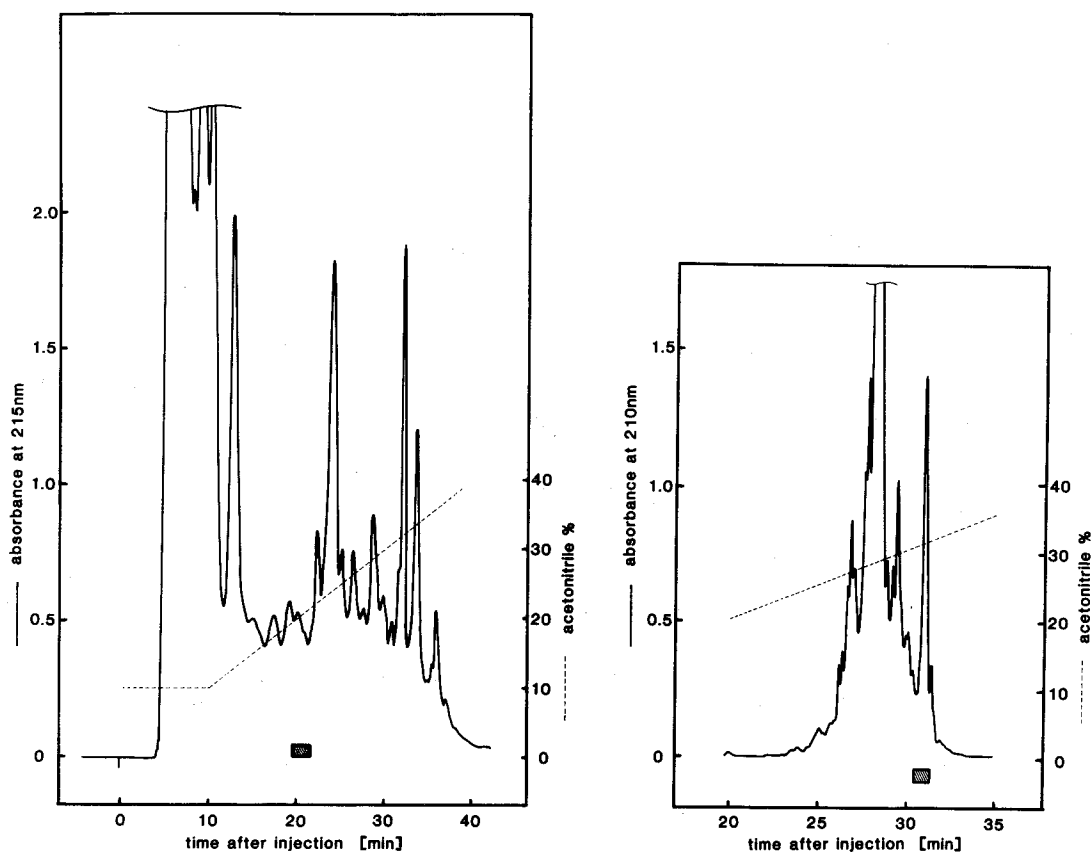


図6. peak B 由来の活性画分の、逆相系カラムを用いたHPLCによる分離

(左) STEP 8

カラム: Cosmosil 5CN-R (4.6 × 150 mm)

緩衝液: 10 mM Na_2SO_4 含有 5 mM
potassium phosphate 緩衝液 pH 3.0

流 速: 1.0 ml/min

(右) STEP 9

カラム: Cosmosil 5C18 (4.6 × 150 mm)

緩衝液: 0.1% trifluoroacetic acid

流 速: 1.0 ml/min

抗 Met-enkephalin 活性は斜線部に溶出した。

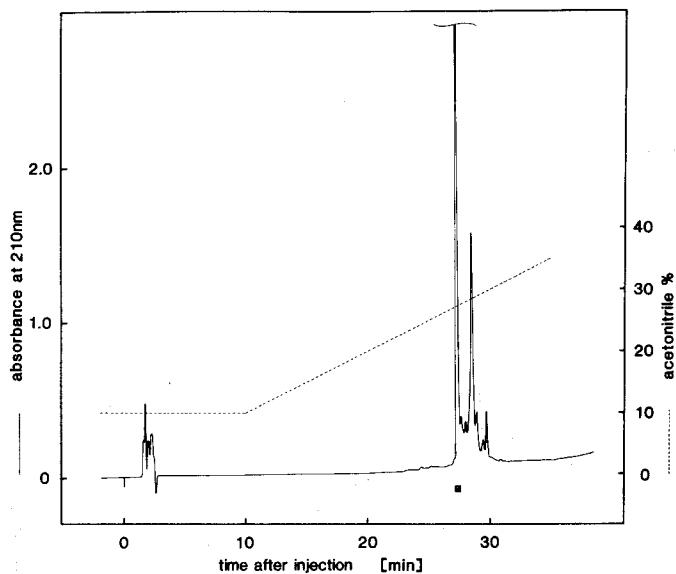


図7. STEP10 : peak B 由来の抗オピオイド物質の単離
 カラム : Cosmosil 5C18 (4.6 × 150 mm)
 緩衝液 : 10 mM Na₂SO₄ 含有 5 mM
 potassium phosphate 緩衝液 pH3.0
 流 速 : 1.0 ml/min

抗 Met-enkephalin 活性は黒く塗りつぶした部分に
 溶出した。

第3章 peak B 由来, 単離ペプチドのアミノ酸分析

以上に述べた2つの抗 Met-enkephalin 活性画分のうち, 先に単離された peak B 由来の活性ペプチドについて, アミノ酸分析, ならびにN末端アミノ酸の同定を行った。

3-1 アミノ酸分析

<実験方法>

peak Bより単離されたペプチドの一部を, 0.1% phenol を含む6N 塩酸とともに減圧下で105℃に18時間保ち, 加水分解した。加水分解により生成したアミノ酸は, 日立835型アミノ酸分析機を用いて同定した。

<実験結果および考察>

表2左に, 単離ペプチドのアミノ酸分析の結果を示した。ところが, このアミノ酸組成をこれまでに生体内から単離された数々の生理活性ペプチドと念のため比較してみたところ, 意外にも

表2. peak B 由来の単離ペプチドと, 合成 [Val⁵]-angiotensin I のアミノ酸組成の比較

	isolated peptide		[Val ⁵]-angiotensin I		
	nmol	ratio	nmol	ratio	correct
Asx	0.878	1.00	0.523	1.00	1
Thr	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0
Glx	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0
Ala	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0
Val	1.103	1.28	0.835	1.60	2
Met	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0
Leu	0.875	1.00	0.516	0.99	1
Tyr	0.626	0.72	0.465	0.89	1
Phe	0.865	0.99	0.529	1.01	1
Lys	0	0	0	0	0
His	1.372	1.58	0.943	1.80	2
Arg	0.989	1.14	0.452	0.86	1
Pro	1.051	1.21	0.727	1.39	1

各アミノ酸の比は Asx (Asp) を1とした。

[Val⁵]-angiotensin I (Asp₁, Val₂, Leu₁, Tyr₁, Phe₁, His₂, Arg₁, Pro₁) と類似していることが判明した。表2右には、同様な条件により合成 [Val⁵]-angiotensin I (ペプチド研究所より購入) のアミノ酸分析を行った結果を並べて記した。この表2から明らかに、両者の各アミノ酸のモル比はきわめて類似した値を示した。

なお、このアミノ酸分析の結果から、単離ペプチドの収量は10 nmolと算出された。

3-2 N末端分析

<実験方法>

N末端アミノ酸の同定には dansyl 法を用いた。試料には単離ペプチド1 nmol を用い、dansyl chloride によるN末端ラベルと加水分解は Gray(1972) の方法に従った。また、dansyl アミノ酸の分離、同定は、Wilkinson(1978) によって報告された HPLC 法に若干の改良を加えて行った。各標準 dansyl アミノ酸の HPLC による分離を図8に示した。

<実験結果および考察>

単離ペプチドから得られた dansyl アミノ酸のピークは12.2分に溶出し、N末端アミノ酸は Asp であると同定された。これもまた、[Val⁵]-angiotensin I の N末端アミノ酸と一致する結果であった。

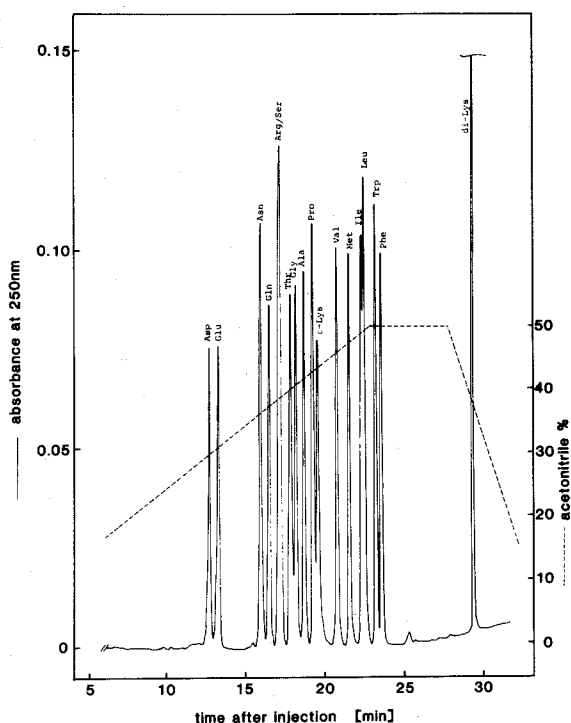


図8. HPLC による標準 dansyl アミノ酸の分離
 カラム: Cosmosil 5C18 (4.6×150 mm)
 緩衝液: 17.5 mM potassium phosphate
 緩衝液 pH7.2
 流速: 1.0 ml/min
 試料: 標準 dansyl アミノ酸 (Sigma)
 各 1 nmol

第4章 活性物質が angiotensin I および II であることの同定

以上のアミノ酸分析の結果から、peak Bより単離した抗オピオイド物質は、おそらく[Val⁵]-angiotensin I であると考えられた。そこで次に、HPLCにおける挙動を合成品と比較することによる同定を試みた。

また、もうひとつの活性画分 peak A は、その全量を単離するまでには至っていなかったが、① STEP 5の項で述べたように、peak Aの抗 Met-enkephalin活性が、peak Bの活性ときわめて類似していたこと、② STEP 6の項で示したゲル濾過により、peak Aは peak Bより小分子量であると考えられたこと — 等の理由により、peak A中の抗オピオイド物質は、おそらく[Val⁵]-angiotensin II であろうと予想された。従って、peak A 由来の活性画分については、さらにHPLCによる精製を進めながら、その活性溶出位置を合成[Val⁵]-angiotensin II と比較検討した。

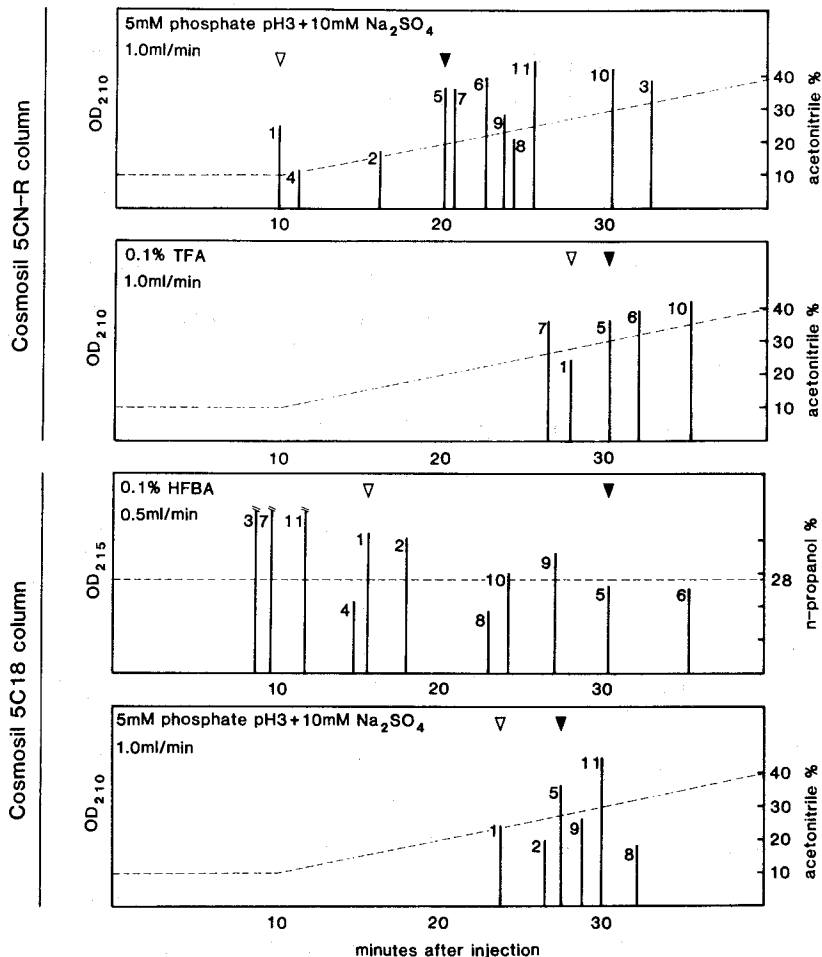
<実験方法>

同定のための HPLC 系としては、Cosmosil 5CN-R, Cosmosil 5C18 の2種類の異なる性質を有する逆相系カラムを用いて、各々、溶媒系を変えた計4種類の溶出条件を設定した。また、それぞれの条件で分離特性が異なっていることを確認するために、[Val⁵]-angiotensin I および II 以外にも9種類の合成ペプチド（いずれもペプチド研究所より購入）の溶出位置を比較した。用いた合成ペプチドとしては、抗オピオイド物質の予想された分子量1000—1800に基き、アミノ酸残基数が8—14である生理活性ペプチドを選んだ。合成ペプチドの溶出位置は紫外吸収のモニターにより、また、抗オピオイド物質の溶出位置は紫外吸収に加えて、GPIでの抗 Met-enkephalin 活性により確認した。

<実験結果および考察>

図9にこれらの結果をまとめて示した。合成ペプチドの溶出位置はそれぞれの条件によって異なり、これら4種類の溶出条件が互いに異なる分離特性を有していることが確認された。しかし、peak A由来の活性物質は、常に[Val⁵]-angiotensin II と、また、peak B由来の活性物質は、常に[Val⁵]-angiotensin I と一致する位置に溶出した。

さらに、図10には、このようにして単離されたペプチドのGPIにおける抗 Met-enkephalin 活性を、それぞれの合成品と比較した結果を示した。このように、peak B 由来の単離ペプチ



1. [Val⁵]-AGT II 2. [Ile⁵]-AGT II 3. CCK-8 4. bradykinin 5. [Val⁵]-AGT I
6. [Ile⁵]-AGT I 7. LH-RH 8. substance P 9. neurotensin 10. somatostatin
11. bombesin

図9. peak A (▽), peak B (▼) から得た抗オピオイド物質のHPLCによる同定

合成ペプチドの溶出ピークは模式化して表現した。それぞれの抗オピオイド物質は矢印で示した時間に溶出した。

TFA : trifluoroacetic acid

HFBA : heptafluorobutyric acid

ドと合成 [Val⁵]-angiotensin I が、あるいは、peak A由来の単離ペプチドと合成 [Val⁵]-angiotensin II が、それぞれ類似した抗 Met-enkephalin 活性を示すことが確認された。また、図10より、[Val⁵]-angiotensin I および II は、ほぼ等しい効力であることが示唆された。

以上の事実より、ウシ脳組織から単離された2つの抗オピオイド物質は、それぞれ [Val⁵]-angiotensin I および II であると同定された。

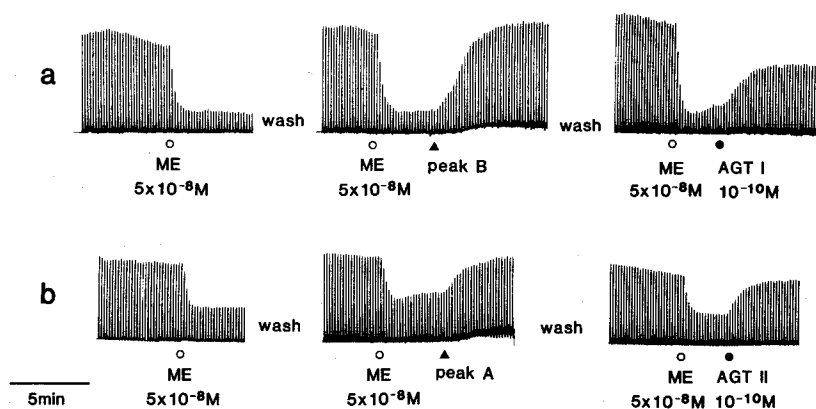


図 10. 精製された抗オピオイド物質と合成 angiotensin の抗 Met-enkephalin 活性の比較

試 料: peak A, B とも単離ペプチドとして約 1pmol

第 1 編 の 考 察

第1編の始めにおいて、脳内生理活性ペプチドの精製に関する4つの問題点を列挙したが、本研究において内在性抗オピオイド物質を精製した経験から、これらの問題点に対し、次のような対応策が有効であると考えられる。

- (1) 簡便なスクリーニング法として用いたGPIは、図10に示したように、1 pmolという微量の抗オピオイド物質を検出できた。このように高感度なスクリーニング法を用いることにより、大量の抽出物の中にごく微量含まれていた抗オピオイド物質の検出と精製が可能になったと考えられる。
- (2) 原料としては40 kgという大量の脳組織が必要であった。しかし、さらに効率の良い精製を行うためには、予め、原料を脳の一部位に限定して量を減らしたり、精製の初期段階に、より濃縮率の良い処理を用いる、等の処置が必要であろう。
- (3) 抽出処理の項(p. 8)でも述べたように、本研究で用いた低温抽出法によっても、抽出、精製過程を通して、内因性プロテアーゼによる二次的分解は、十分抑えられたと推定される。
- (4) 吸着の問題は、カラム溶出液へのn-propanolの添加や、メタノール塩酸混液による吸着ペプチドの洗い出しによってある程度防ぐことができる。しかし、HPLCによる精製で、それぞれの段階ごとにやや低い回収率(50~70%)であったため、STEP 4 で初めて抗Met-enkephalin 活性を検出してから単離までの総活性回収率は、結局、10~20%に低下した。今後、HPLCカラムの改善等による吸着への対応が重要課題と考えられる。

GPIにおける抗Met-enkephalin 活性を指標にして、ウシ脳組織から精製した抗オピオイド物質は、当初は新規物質と考えて実験を進めていたが、最終段階になって意外なことに[Val⁵]-angiotensin I および II であることが明らかになった。

Angiotensin は元来、血中に存在する昇圧性ペプチドとしてよく知られており、その血中angiotensin の生合成経路は、図11に示したようなrenin-angiotensin 系として既に解明されている。Angiotensin には動物種差があり、哺乳類の場合はIle⁵型とVal⁵型に大別されるが、一般に両者の生理活性にあまり差はないと言われている(Regori ら, 1974)。本研究で得られたのは、従来、ウシ血中での存在が証明されている(Elliott と Peart, 1956) Val⁵ 型で

小 括

1. 抗オピオイド活性のスクリーニング法として高感度なモルモット摘出回腸縦走筋検定法により，ウシ脳内に存在する微量の抗オピオイド物質を検出した。（第1章）
2. このスクリーニング法を用いて，100頭分のウシ脳組織から全10段階の精製により，2つの抗オピオイド物質を単離した。（第2章）
3. これら2つの抗オピオイド物質は，各種同定操作により[Val⁵]-angiotensin IおよびIIであると同定された。（第3，4章）

第 2 編

Angiotensin の抗オピオイド作用

第1編に示したように、著者は新たに内在性抗オピオイド物質として、ウシ脳組織より[Val⁵]-angiotensin IおよびIIを単離した。しかし、この angiotensin I および II が、生体内においてどのような抗オピオイド作用を有しているかは、たいへん興味ある問題である。

ところで、従来からオピオイドの効力評価には、次の3種類の試験法が広く一般に用いられている。

- (1) 脳組織膜標本におけるオピオイドレセプターとの結合試験法。
- (2) オピオイドレセプターを有する末梢組織標本を用いた in vitro 試験法。
- (3) 鎮痛検定法による in vivo 試験法。

そこで、著者はこれら3種類の試験法におけるオピオイドの効果に及ぼす angiotensin I および II の影響を検討することにより、angiotensin の抗オピオイド作用の評価を試みた。

以下、第2編として、それぞれから得られた知見について4章に分けて論述する。

第1章 脳組織オピオイドレセプターに対する作用

まず, angiotensin が抗オピオイド物質として働く機序には, 大別して次の2つが考えられた。

- (1) オピオイドレセプターに対するオピオイドの結合を阻害することによる拮抗。
- (2) オピオイド結合は阻害しないが, 同一の細胞あるいは組織に対して, オピオイドと相反する作用を示すことに起因する生理的な拮抗。

そこで, angiotensin がオピオイドレセプターに結合するかどうかを検討するために, 脳組織膜標本を用いてオピオイドレセプター結合実験を行った。

<実験方法>

^3H -リガンドを用いたオピオイドレセプター結合実験は, 従来, 当研究室で行われていた方法 (Amano ら, 1984) に準じた。膜標本の作成はモルモット, ラット, ウサギの脳を用いた。動物を断頭後, ただちに脳を摘出し, 小脳を除いた全脳を35倍量の50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) とともに Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートは 4°C で10分間, $45,000 \times g$ で遠心し, 沈渣を同緩衝液にて懸濁して脳組織膜標本とした。レセプター結合実験におけるインキュベートは 0°C , 3時間とし, 特異的結合量は levallorphan 10^{-5}M 存在下での結合量を差し引くことにより求めた。 ^3H -リガンドとしては, オピオイドレセプターのサブタイプを考慮し, μ レセプター選択性リガンドとして ^3H -naloxone (45.0 Ci/mmol, δ レセプター選択性リガンドとして ^3H -[D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin (49.3 Ci/mmol), κ レセプター選択性リガンドとして ^3H -dynorphin (1-9) (28.4 Ci/mmol) を用いた。これら ^3H -リガンドは, すべて Amersham 社より日本アイソトープ協会を通じて購入した。

<実験結果および考察>

モルモットの脳組織膜標本を用いて, [Val⁵]-angiotensin I および II が各 ^3H -リガンド結合量に及ぼす影響を検討した結果を表3に示した。[Val⁵]-angiotensin I および II とともに, 10^{-6}M という大量を加えても, いずれのリガンドの特異的結合量にも有意な減少は認められなかった。また, ラットあるいはウサギの脳組織膜標本を用いて同様な実験を行った場合も, 同じく各 ^3H -リガンドの特異的結合量に変化は認められなかった。

これらの結果から, [Val⁵]-angiotensin I および II はオピオイドレセプターに結合しな

いこと、あるいはオピオイドのオピオイドレセプターに対する結合を阻害しないことが明らかになった。

表3. 各種 ^3H -リガンドのオピオイドレセプター結合に
及ぼす $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I と II の効果

radio ligand	brain homogenate	specific binding [mean %, $n \approx 6$]		
		control	AGT I 10^{-6}M	AGT II 10^{-6}M
^3H -naloxone	guinea-pig	0.80	0.78	0.77
^3H - $[\text{D-Ala}^2, \text{D-Leu}^5]$ -enkephalin	guinea-pig	0.66	0.75	0.70
^3H -dynorphin (1-9)	guinea-pig	1.99	1.80	1.76

使用したリガンド濃度は、それぞれ、 ^3H -naloxone 1.0 nM ,
 ^3H - $[\text{D-Ala}^2, \text{D-Leu}^5]$ -enkephalin 1.0 nM , ^3H -dynorphin
(1-9) 2.0 nM である。

第2章 モルモット摘出回腸縦走筋における 抗オピオイド作用

先の精製の際にスクリーニング法として用いた GPI は、脳内オピオイドレセプター結合実験によって分類されるサブタイプのうち、主として mu および kappa レセプターを有している (Lord ら, 1977)。この GPI において, $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II は著明な抗 Met-enkephalin 活性を示したが (図 10 参照), 先のレセプター結合実験の結果から, その作用はこれら mu および kappa レセプターを介さない生理的な拮抗現象であると考えられた。そこで著者は, GPI における angiotensin I および II の抗 Met-enkephalin 活性を定量的に評価し, さらにその機序について詳細に検討した。

2-1 抗 Met-enkephalin 活性の定量的評価

<実験方法>

標本の作成, 刺激条件, 記録等はスクリーニングの項 (p.5) で述べた方法と同様に行った。抗 Met-enkephalin 活性の定量的評価には, IC_{50} の比から Schild (1957) の方法により求められる pA_2 値を用いた。評価の比較対照としては naloxone を用い, $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II, naloxone は Met-enkephalin 投与の 5 分前に適用した。

<実験結果>

図 12 に示したように $[\text{Val}^5]$ -angiotensin II は 10^{-10} M という低濃度でも, Met-enkephalin の用量反応曲線を著明に (IC_{50} 比, 3.8 倍) 右へ平行移動させた。

表 4 には, 図 12 と同様な実験から $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II と, naloxone についてそれぞれ求められた pA_2 値を示した。Schild plot において, これらの slope factor は 0.95 ± 0.1 の範囲であった。なお, Met-enkephalin の IC_{50} は $43.7 \pm 5.5 \text{ nM}$ (mean \pm SEM) であった。

<考 察>

$[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II の pA_2 値は, ともに naloxone より約 2.0 大きな値であった。すなわち, これらの抗 Met-enkephalin 活性は naloxone の約 100 倍強力であることが明らかになった。また, ことに $[\text{Val}^5]$ -angiotensin II の pA_2 値は濃度に換算して 3×10^{-11} M と, 通常の血中濃度 (p. 21 参照) に匹敵する低濃度であった。このことは, 一般に腸管におけるオピオイド系が, 血中 angiotensin 系によって制御を受けている可能性を示唆している。

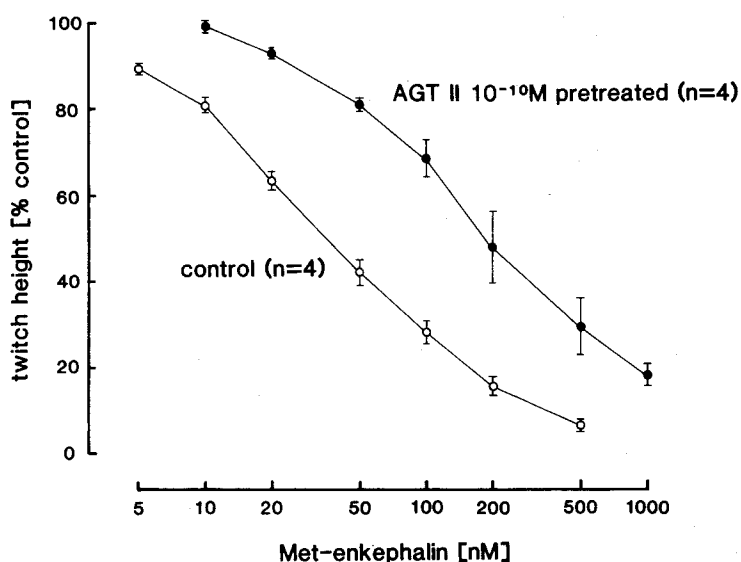


図 12 $[\text{Val}^5]$ -angiotensin II 前処置による Met-enkephalin の用量反応曲線の平行移動

表 4. Met-enkephalin の作用に対する $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II と, naloxone の pA_2 値の比較

antagonist	(n)	pA_2	(95% confidential limits)
$[\text{Val}^5]$ -angiotensin I	(9)	10.41	(10.05 - 10.76)
$[\text{Val}^5]$ -angiotensin II	(6)	10.53	(10.27 - 10.79)
naloxone	(8)	8.52	(8.23 - 8.81)

$$\text{Met-enkephalin IC}_{50} [\text{nM}] = 43.7 \pm 5.5 \quad (n=12)$$

95 %信頼限界は最小自乗法により求めた。

さらに, $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II の抗 Met-enkephalin 作用は, ① Met-enkephalin の用量反応曲線を平行にシフトさせること, ② Schild plot における slope factor が 0.95 に近いこと — から広義の競合的拮抗の性質 (Schid, 1957) を有しており, これらの抗オピオイド作用が, 生理的拮抗ではあっても, その作用点がオピオイドの作用部位と近接しているか, 同一神経伝達物質の遊離の抑制と促進といった拮抗関係にあることが示唆される。

2-2 抗オピオイド作用の本体

以上のように, $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I と II は GPI おいてほぼ等しい効力を示したが, 一般に angiotensin の活性発現型は angiotensin II であり, 末梢組織において, angiotensin I は不活性な前駆体であることが知られている (Regoli ら, 1974)。そこで, どちらのペプチドが抗オピオイド作用の本体であるかについて検討し, また, Ile^5 型との比較も行った。

<実験方法>

これまでと同じく GPI を用い, 標本に予め, angiotensin converting enzyme の特異的阻害剤である Captopril (三共), あるいは, angiotensin II レセプターに対する競合的拮抗薬である Saralasin (ペプチド研究所) を適用した。Angiotensin には, これまでの $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I, II に加えて, $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin I, II も使用した。

<実験結果>

図 13 に結果の一部を示した。 Val^5 型と Ile^5 型の angiotensin の抗 Met-enkephalin 作用に差は認められなかった (図 10 参照)。 $[\text{Val}^5]$ -および $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin I の効果は, Captopril (10^{-5}M), あるいは Saralasin (10^{-7}M) により消失した。また, $[\text{Val}^5]$ -および $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin II の効果は Captopril では影響を受けなかったが, Saralasin により消失した。

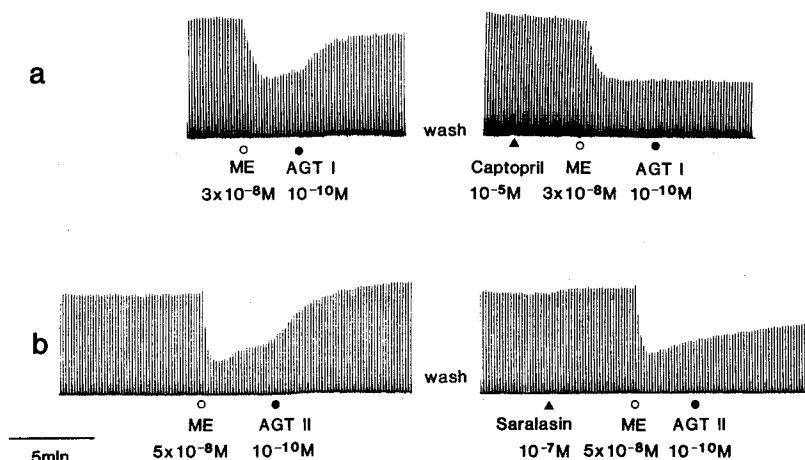


図 13. $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin I および II の抗 Met-enkephalin 作用に及ぼす Captopril, Saralasin の影響

<考 察>

抗オピオイド作用に関して, angiotensin の Ile⁵ 型と Val⁵ 型に差がないことが確かめられた。しかし, angiotensin I はそれ自体では不活性であり, GPI に存在する angiotensin converting enzyme によりすみやかに angiotensin II に転換されてから抗オピオイド作用を示し, また, angiotensin II は angiotensin II レセプターを介して, その効果を発現するものと推定される。すなわち, 抗オピオイド作用の本体は angiotensin II であると考えられる。

2-3 angiotensin II の作用機序

以上の知見から, GPI における angiotensin の抗オピオイド作用は, angiotensin II が, オピオイドレセプターではなく, angiotensin II レセプターに結合することに起因すると推論された。そこで次に, angiotensin II がそのレセプター結合以降, どのような機序によりオピオイドに相反する作用を示すのかが問題となった。しかし, これまでの実験では GPI において電場刺激により誘発される攣縮に対する作用にのみ着目してきたが, 機序を検討する目的で使用する各種薬物は, そのほとんどが攣縮発生を阻害するために, これまでのような方法で angiotensin II の作用機序を検討することは無理であった。そこで, 従来より angiotensin II は高濃度で GPI を収縮させることが知られていた (Khairallah と Page, 1961) ので, この angiotensin II の GPI 収縮作用に着目して, 抗オピオイド作用の機序を検討した。

<実験方法>

電場刺激を与えない GPI を用い, その他の条件はすべてこれまでと同様にした。また, 先の結果から Val⁵ 型と Ile⁵ 型の angiotensin に効力差がないことが明らかであったので, 以下の実験には [Ile⁵]-angiotensin II を用いた。

<実験結果>

まず, 後の実験に用いる [Ile⁵]-angiotensin II の規準的濃度を決めるために, 収縮高の用量依存性を検討し, 他の数種の GPI 収縮性神経ペプチドとも比較した (図 14)。[Ile⁵]-angiotensin II は, 10^{-7} M を最大として用量依存的に, substance P と同程度の強い GPI 収縮活性を示した。しかし, 10^{-8} M 以上の濃度においては, 洗浄と 15 分間の回復の後に繰り返し投与した場合, 収縮高が漸次, 著明に減少する tachyphylaxis が認められた。ことに 10^{-6} M では, 1 回投与によってもすみやかに desensitization を生じ, 収縮高は 10^{-7} M 以下であった。従って, 以下の実験には再現性の良い収縮高が得られた上限の濃度, 2×10^{-9} M を適用した。

そこで次に, [Ile⁵]-angiotensin II, 2×10^{-9} M の収縮に及ぼす, 各種薬物の前処理の影響を検討した。その結果, 図 15 に示したように, normorphine (10^{-6} M) あるいは atropine (10^{-5}

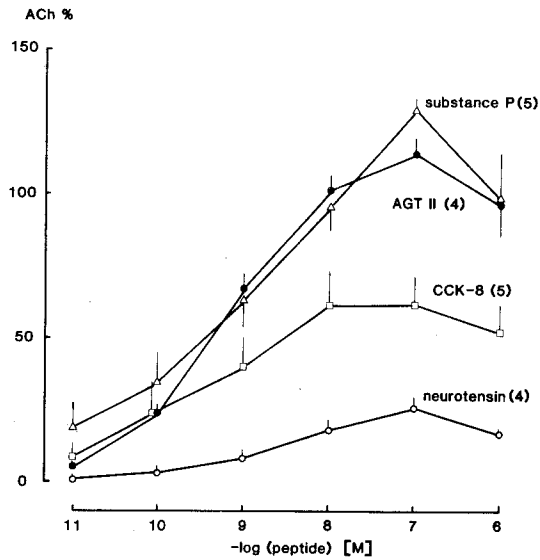


図 14. $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin II と数種の GPI 収縮性神経ペプチドの用量-収縮曲線

縦軸は ACh 10^{-5}M による収縮高に対する $\text{mean} \pm \text{SEM}$ % で示した。括弧内は例数。

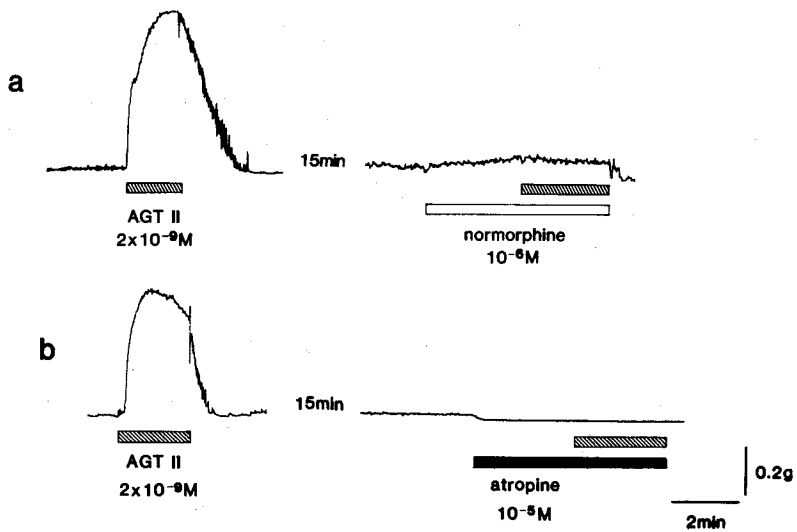


図 15. $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin II の収縮に及ぼす normorphine と atropine の抑制作用

表5. [Ile⁵]-angiotensin II の収縮に及ぼす各種薬物の
前処置の影響

pretreatment	dose [M]	effect
physostigmine	10 ⁻⁷	↑
atropine	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵	↓
hexamethonium	10 ⁻⁵	→
methysergide	10 ⁻⁵	→
diphenhydramine	10 ⁻⁶	→
[D-Pro ² , D-Trp ^{7,9}]- substance P	10 ⁻⁶	→
tetrodotoxin	10 ⁻⁸	↓

↑ = potentiation. → = no effect. ↓ = inhibition.

M) の前処置は, [Ile⁵]-angiotensin II による収縮を完全に消失させた。また, 表5に示したように, physostigmine (10⁻⁷M) により増強が観察され, より低濃度の atropine (10⁻⁸M) ~ 10⁻⁵M) や tetrodotoxin (10⁻⁸M) では抑制が認められた。しかし, hexamethonium (10⁻⁵M), methysergide (10⁻⁵M), diphenhydramine (10⁻⁶M), あるいは substance P antagonist である [D-Pro², D-Trp^{7,9}]-substance P (Leander ら, 1981) (10⁻⁶M) はそれぞれ無影響であった。

<考 察>

これら [Ile⁵]-angiotensin II の収縮に対する各種薬物の影響の結果から, GPI における angiotensin II の作用機序について, 次のように考えられる。

- (1) 従来, オピオイドは GPI において ACh 遊離を抑制されている (Paton, 1957)。また atropine は ACh のムスカリン様レセプターにおける競合的拮抗薬である。従って, normorphine と atropine により angiotensin II の収縮が完全に消失したことから, この収縮は ACh を遊離させることに起因すると推論される。physostigmine により収縮が増強されたことも, 強くこれを支持するものである。
- (2) Hexamethonium は無影響であった。すなわち, angiotensin II が前シナプス細胞体に存在するニコチン様レセプターに対して直接作用し, ACh を遊離させる可能性は否定される。

- (3) Methysergide, diphenhydramine,あるいは substance P antagonist が無影響であったことから, それぞれ, セロトニン, ヒスタミン, あるいは substance P のような他の強力な内因性腸管収縮物質は, angiotensin II の ACh 遊離に介在しないと考えられる。
- (4) 低濃度の tetrodotoxinによって, 神経細胞における興奮の伝導を阻害した場合にも収縮が抑制したことから, angiotensin II の作用点, すなわち angiotensin II レセプターは, 主として ACh 含有ニューロンの細胞体側に存在すると推定される。

以上で得られた GPI に関する知見を総合すると, angiotensin II の抗オピオイド作用の機序は, 図 16 に示したような angiotensin II とオピオイドの相対関係として解釈される。すなわち, GPI に存在する ACh 含有ニューロンに対して, オピオイドは神経終末に存在すると言われているオピオイドレセプターを介して ACh 遊離を抑制するが, angiotensin II は, 主として細胞体側に存在する angiotensin II レセプターを介して ACh 遊離を促進していると考えられる。

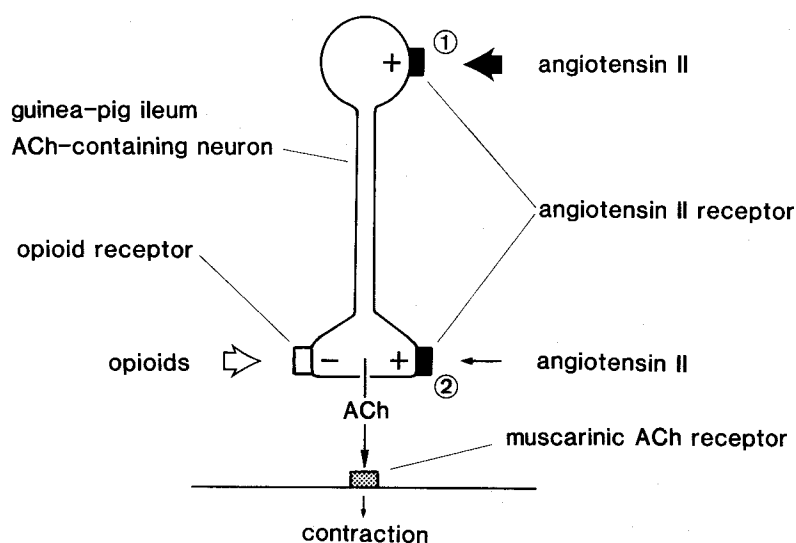


図 16. GPI における angiotensin II とオピオイドの相互作用に関する模式図

+ は遊離促進, - は遊離抑制を示す。

このようにして, angiotensin II は GPI においてオピオイドに相反する作用を有する, 生理的な拮抗物質であると推定される。また, 先に述べたように (p. 29) angiotensin I の作用は, angiotensin II に転換されてから発現するものと考えられる。

第3章 マウスおよびウサギ摘出輸精管における抗オピオイド作用

オピオイドの摘出末梢組織標本を用いた効力検定法として、GPI の他にしばしば用いられるものに、マウス摘出輸精管標本とウサギ摘出輸精管標本がある。従来より、オピオイドレセプターのサブタイプのうち、マウス輸精管には、mu, delta, kappa レセプターが (Lordら, 1977), ウサギ輸精管には kappa レセプターのみが (Oka ら, 1981) 存在すると言われており、また、GPI が ACh 遊離を介した収縮系であるのに対し、これらはともに noradrenaline 遊離を介した収縮系であることが知られている。

そこで著者は、これらの摘出輸精管標本における angiotensin II の抗オピオイド作用についても、若干の検討を加えた。

<実験方法>

マウス摘出輸精管標本の作成は、Hendersonら (1972) の方法に、また、ウサギ摘出輸精管標本の作成は Oka ら (1981) の方法に従った。装置、記録等は GPI の場合 (p. 5) と同様にしたが、栄養液としては Mg^{2+} イオンを除いた Krebs 液を用い、刺激の duration を 1.0-2.0 msec に変更した。対照となるオピオイドとしては、標本のオピオイドレセプターのサブタイプを考慮し、マウスの場合 Leu-enkephalin, ウサギの場合は dynorphin (1-13) を用いた。また angiotensin には $[Ile^5]$ -angiotensin II を用いた。

<実験結果>

$[Ile^5]$ -angiotensin II は、マウス摘出輸精管標本において $10^{-8} M$ で Leu-enkephalin, $2 \times 10^{-8} M$ による攣縮抑制を回復させた (図 17a)。また、ウサギ摘出輸精管標本においては $10^{-7} M$ の投与により、dynorphin (1-13), $10^{-6} M$ による攣縮抑制を回復させた (図 17b)。しかしながら、それぞれにおいて、これらの量の $[Ile^5]$ -angiotensin II を単独に投与した場合でも、約 20% の攣縮増強が観察された。また、これらの抗オピオイド作用は、Saralasin, $10^{-6} M$ の前処置により消失した。

<考 察>

マウスおよびウサギ摘出輸精管標本においても、angiotensin II は angiotensin II レセプターを介する抗オピオイド作用を示した。しかし、その効力は GPI とくらべるとかなり弱く、これらの組織においては angiotensin II レセプターがあまり存在しないと考えられる。

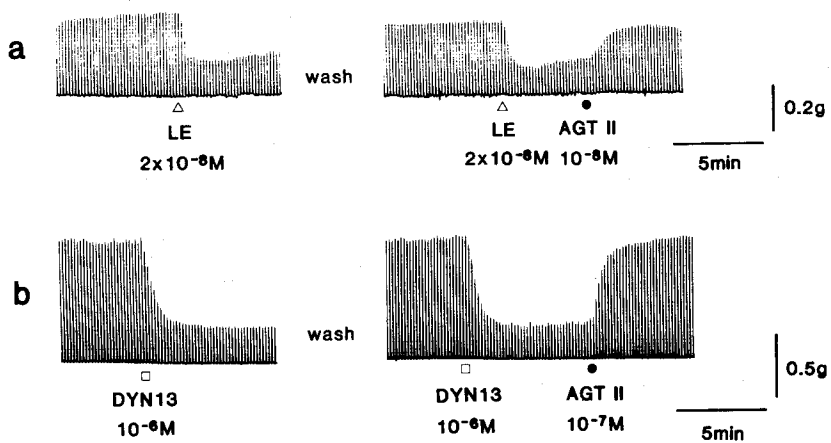


図 17. a. マウス摘出輸精管
b. ウサギ摘出輸精管
における $[\text{Ile}^5]$ -angiotensin II の
抗オピオイド作用

LE : Leu-enkephalin
DYN13 : dynorphin (1-13)

第4章 マウス脳室内投与による morphine 鎮痛減弱作用

以上、摘出組織標本に対する angiotensin の抗オピオイド作用について述べてきたが、それらの作用は、生体内では angiotensin の末梢臓器における抗オピオイド作用と見なされたものであった。しかし、脳組織から新たに抗オピオイド物質として angiotensin を単離した本研究の意義からすれば、果たして angiotensin が中枢神経系においても抗オピオイド作用を有するかが最も興味あるところである。

そこで、オピオイドの代表薬である、morphine の鎮痛効果に対して、angiotensin II がどのように影響を及ぼすかをマウス脳室内投与法により検討した。その際の鎮痛検定法としては、機械的刺激による tail-pinch 法と、熱刺激による hot plate 法を併用した。

<実験方法>

以下の実験には、すべて 15-20g の雄性 dd-K マウスを使用した。薬物は生理食塩水に溶解させ、10 μ l の一定容量を Haley と McCormick (1957) の方法に従い、マウス脳室内に注入した。用いた薬物は morphine \cdot HCl と [Ile⁵]-angiotensin II であり、これらを組み合わせて投与する場合には、予め混合して溶解させ、同時に注入した。また、注入した薬液の分布を知る目的で、別の動物に thionine 色素水溶液を同液量注入した。

Tail-pinch 法 (Takagi ら, 1966) は、マウス尾根部に 200g 一定圧の動脈クレンメを適用したとき観察される、クレンメへのかみつきの反応を指標とした。マウスは予め 2 秒以内にかみつきの反応を起こしたものを選択し、薬物投与後は、5, 10, 15, 30, 45, 60 および 90 分の各測定時において、6 秒以内にかみつきの反応を起こさないものを鎮痛効果ありと判定した。得られた結果は、全動物数に占める鎮痛効果を示した動物数の割合を % analgesia で表わした。

Hot plate 法は、マウスを 52 \pm 1 $^{\circ}$ C に保った熱板上に置いたとき観察される、後肢への licking (足底を舐める行動) あるいは jumping を指標とした。マウスは予め 40 秒以内にこれらの行動を起こしたものを選択し、薬物投与後は、15, 30, 45, 60, および 90 分の各測定時において、これらの行動を起こすまでの潜時 (最大 60 秒まで) を測定した。得られた結果は、次式により analgesic index として表わした。

$$\text{analgesic index } [\%] = (T_1 - T_0) / (60 - T_0) \times 100$$

T_1 : 薬物投与後の各測定時における潜時 [秒]

T_0 : 薬物投与 30 分前と 15 分前における潜時の平均 [秒]

また、これらの鎮痛検定を行う際、各測定時において、マウスに morphine を投与した場合、特異的に観察される挙尾反応を記録した。挙尾反応はマウスの尾先端部の水平面に対する角度で判定し、 $0^{\circ} \sim 45^{\circ}$ を 0, $45^{\circ} \sim 90^{\circ}$ を 1, 90° 以上を 2 として数え、得られた結果は、すべての動物が各測定時に示した値の和から、1 匹の動物当たりの平均値を求めて、Straub's-tail score として表わした。

<実験結果>

Thionine 色素水溶液の注入 5 分後に、動物を断頭して脳を摘出し、色素沈着の分布を観察した。色素沈着は、側脳室に高濃度に認められ、次いで視索周囲の脳底部、脳幹底面、第三脳室、中脳水道周囲、第四脳室の順であった。

Tail-pinch 法において、morphine は予めピーク時に約 3 分の 2 の動物に対して鎮痛効果を発現する用量、2.5 nmol に設定した。図 18 には、この morphine 2.5 nmol に対して、その 250 分の 1 に相当する用量の $[Ile^5]$ -angiotensin II 10 pmol を同時投与した結果を示した。Morphine の鎮痛効果は、このようにきわめて低用量の $[Ile^5]$ -angiotensin II の併用により、投与後 5 分から 90 分までの全般にわたって減弱された。また、同時に測定した Straub's-tail score (5 測定点) は、morphine 単独の場合 2.53, $[Ile^5]$ -angiotensin II を併用した場合 2.50 と変化は認められなかった。なお、その他の異常行動も観察されなかった。

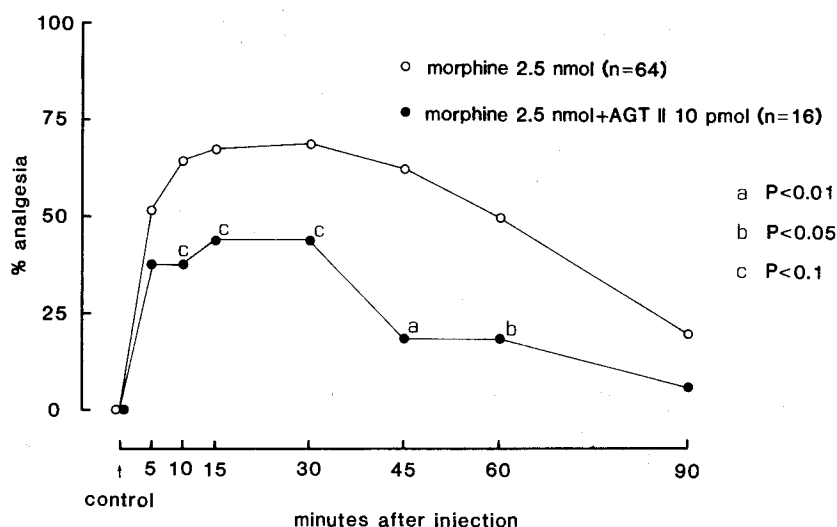


図 18. マウス tail-pinch 法による、脳室内投与された $[Ile^5]$ -angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用

有意性検定は χ^2 -test により行った。

図 19 には、同用量の morphine と $[Ile^5]$ -angiotensin II を用いて、 $[Ile^5]$ -angiotensin II の併用が morphine 鎮痛に及ぼす影響を hot plate 法により検討した結果を示した。Hot plate 法においても、 $[Ile^5]$ -angiotensin II は投与後 15, 30, 45 分の各測定時で、有意に morphine の鎮痛効果を減弱させた。しかし、その差は tail-pincn 法の場合ほど顕著ではなかった。また、同時に測定した Straub's-tail score (3 測定点) は, morphine 単独の場合 1.05, $[Ile^5]$ -angiotensin II を併用した場合 1.00 とやはり変化は認められなかった。

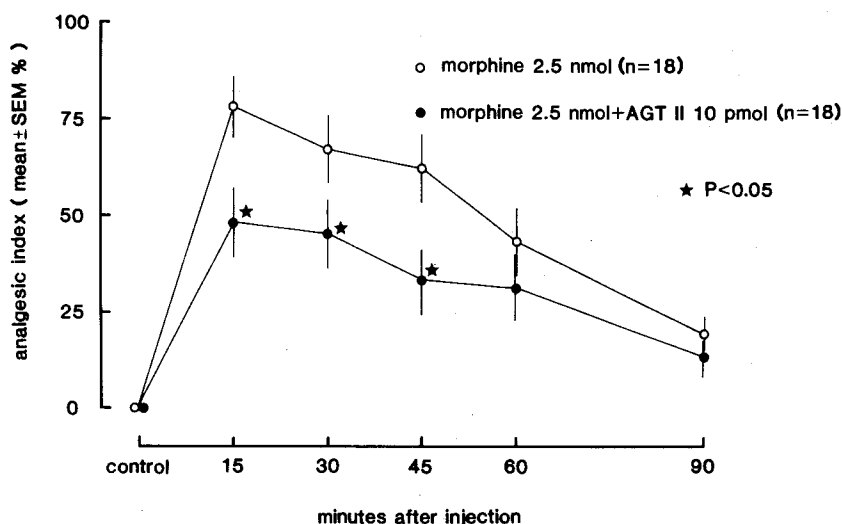


図 19. マウス hot plate 法による、脳室内投与された $[Ile^5]$ -angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用

有意性検定は unpaired t-test により行った。

次に、これらの鎮痛検定法のうちで、 $[Ile^5]$ -angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用がより顕著に認められた tail-pinch 法を用いて、 $[Ile^5]$ -angiotensin II の作用の用量依存性を検討した。図 20 に示したように、 $[Ile^5]$ -angiotensin II は 0.1 pmol から 10 pmol までの範囲で、用量依存的に morphine の鎮痛効果を減弱させた。また、この作用は約 50 % の抑制が観察された 10 pmol で最大になり、それ以上の 50 pmol では頭打ち現象を示した。また、tail-pinch 法において、これらの用量の $[Ile^5]$ -angiotensin II を単独で投与しても、行動上の異常や鎮痛作用は認められなかった。

さらに、 $[Ile^5]$ -angiotensin II を単独投与した場合の鎮痛検定法に及ぼす影響については、hot plate 法を用いて詳細に検討した。表 6 に示すように、 $[Ile^5]$ -angiotensin II は 0.1 pmol から 100 pmol までの範囲で単独投与しても、後肢 licking あるいは jumping 潜時に、生理

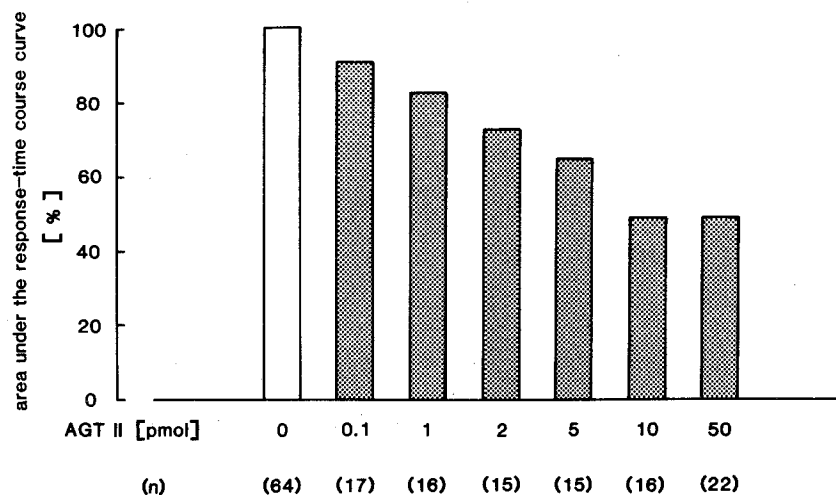


図 20. マウス tail-pinch 法による, [Ile⁵]-angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用の用量依存性

縦軸は、各用量で得られた鎮痛効果を投与後 90 分まで経時的にプロットしたグラフ (図 18 参照) から、その曲線下の面積を求め、morphine 単独の場合に対する % で表わした。

表 6. マウス脳室内に [Ile⁵]-angiotensin II を単独投与した時の、hot plate 法における後肢 licking あるいは jumping 潜時 (mean ± SEM 秒)

i.c.v. administration			minutes after administration						
dose (pmol/mouse)		(n)	-30	-15	15	30	45	60	90
saline		(10)	24.6 ±1.7	24.5 ±1.9	23.5 ±2.8	21.4 ±3.0	19.7 ±2.8	21.2 ±2.3	20.1 ±3.4
AGT II	0.1	(10)	24.4 ±1.9	22.3 ±2.8	20.1 ±1.9	24.0 ±1.7	26.7 ±3.5	23.4 ±4.5	26.0 ±3.2
AGT II	1	(10)	22.2 ±2.3	21.2 ±2.4	20.8 ±3.2	21.8 ±2.1	20.6 ±2.7	24.6 ±3.6	23.5 ±3.2
AGT II	10	(10)	25.7 ±2.3	20.1 ±3.0	24.6 ±1.9	21.6 ±2.6	22.1 ±3.9	23.3 ±1.7	25.3 ±3.7
AGT II	100	(10)	21.7 ±1.7	18.5 ±2.1	19.7 ±1.6	17.6 ±1.6	16.7 ±2.8	16.9 ±2.8	19.3 ±2.9

食塩水投与群との間の有意な差は認められなかった。

< 考 察 >

マウス脳室内に投与された[Ile⁵]-angiotensin II は、tail-pinch 法と hot plate 法のいずれにおいても、同時投与された morphine の鎮痛効果を減弱させることが明らかになった。しかし、すでに第2編、第1章で述べたように、angiotensin II はオピオイドのレセプター結合には影響しないことから、この作用は生理学的な拮抗現象であると解釈される。

また、この angiotensin II による morphine 鎮痛減弱作用には、次のようないくつかの特徴が認められた。

- (1) Angiotensin II は morphine による挙尾反応に対しては減弱反応を示さない。従来、morphine による挙尾反応はマウスに特異的であり、おそらく脊髄興奮作用によるものであると言われている。Angiotensin II は、このような morphine の興奮性の作用には影響しないと考えられる。
- (2) Tail-pinch 法と hot plate 法では、morphine 鎮痛減弱作用の強度に差が認められる。すなわち、用いる疼痛刺激の種類、あるいは鎮痛検定の方法によっては、その作用を検出しやすいものと、し難いものがあるように思われる。
- (3) Angiotensin II が示した morphine 鎮痛減弱作用は、特に tail-pinch 法において長い持続を示した。一般に脳内におけるペプチド分解酵素の活性は高く、例えば GPI において morphine とほぼ同効力である Met-enkephalin は、脳内投与してもきわめて弱く、かつ持続時間の短い鎮痛効果しか示さない (Amano ら, 1984)。また Met-enkephalin の分解酵素であり、その失活の主要因である aminopeptidase は、angiotensin II の分解酵素でもある。つまり、脳内投与された angiotensin II は、すみやかに分解されると考えられる。しかし、ごく最近 Simonnet ら (1984) は、脳内において angiotensin II が分子量約1万のキャリアータンパク様物質に結合することを見い出している。従って、脳内投与された angiotensin II は酵素分解に対して何らかの保護を受けている可能性が考えられる。
- (4) Morphine 鎮痛減弱作用は、10pmol というきわめて低用量の angiotensin II で認められたが、用量を増やしても morphine の効果を完全に消失させるまでには至らなかった。先に、angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用は生理学的な拮抗現象であろうと述べたが、もし、その機序が何らかの神経系における相反的な作用 (例えば、GPI における ACh 系のよう) に基づくとすれば、angiotensin II と morphine の相互作用は、morphine の複数の作用点 (佐藤, 1981) のうちの一部で起こっていると考えられる。

(5) Angiotensin II は、単独投与で鎮痛や痛覚過敏、あるいは行動上の異常を起こさなかった。すなわち、これまでに angiotensin II を中枢性に投与した場合の薬理作用としては、①飲水行動の誘起、②中枢性の血圧上昇、③ vasopressin の遊離——などが知られている (Ganten ら, 1984) が、morphine 鎮痛減弱作用が、これらの二次的な影響に起因するものではないことが示された。また特に、痛覚過敏が認められなかったことから、angiotensin II の morphine 鎮痛減弱作用が、単なる痛覚過敏と morphine 単独の鎮痛効果の和として起こるのではなく、脳内オピオイドレセプターに morphine が作用した時にのみ起こる現象であることが示唆される。

以上のように、angiotensin II は中枢神経系においても抗オピオイド物質として働くことが示唆された。しかし、その作用機序については今後の解明を待たねばならない。

第 2 編 の 考 察

Angiotensin II の抗オピオイド作用は、オピオイドレセプターを介さない生理学的な拮抗現象であることが示された。しかしながら、その効果は GPI においても、マウス鎮痛検定法においても、きわめて微量で発現する点で、生理的条件下でも angiotensin 系はオピオイド系と密接に関わり、オピオイドの作用を調節している可能性が考えられる。

Angiotensin 系とオピオイド系の関連は、例えばその生合成、分解に関与する酵素の一部が共通している点でも興味深い。

図 21 に示すように、angiotensin converting enzyme は enkephalin 分子の Gly³-Phe⁴ 結合を切断する enkephalinase 活性を有していることが知られている (Goldstein と Snyder, 1979)。また、aminopeptidase は angiotensin II から Asp¹ を離脱させ angiotensin III にする酵素であるが、一方、すべての内在性オピオイドペプチドに共通する活性発現部位である Tyr¹-Gly² 結合を切断し、不活性化に寄与する酵素でもある。これらの酵素については、すでに脳内に存在することが明らかにされており、(Meek ら, 1977; Yang と Neef, 1972), また GPI に存在することも示唆されている (Geary ら, 1982)。さらに、最近 Lee と Snyder (1982) は、新たに angiotensin II と enkephalin に対して高い特異性を示す分解酵素として dipeptidyl-aminopeptidase III (EC 3. 4. 14. 4) の存在をラット脳において明らかにしている。

このように、生体内において共通の酵素系が存在することは、すなわち、angiotensin 系とオピオイド系の活性が、同時にこれらの酵素によって制御されている可能性を示唆していると考えられる。

近年、中枢神経系における angiotensin 系とオピオイド系の相対的な関係は Summy-Long ら (1981, 1983) によっても示唆された。彼らは、ラットに angiotensin II を中枢投与した時の飲水行動の誘起や vasopressin 遊離が、オピオイドにより抑制されることを報告している。また、かつて Elie ら (1970) は、angiotensin II をネコ大脳皮質局所に投与することにより、皮質表面からの ACh 遊離量が増加することを報告した。一方、Jamandas ら (1974) は、ラットで morphine により大脳皮質からの ACh 遊離量が減少することを見い出している。従って、脳内においても GPI と同様に、オピオイドは ACh 遊離の抑制を、angiotensin II は ACh 遊離の促進を引き起こし、ACh 遊離の制御において、これらが相反的な関係にある可能性が考

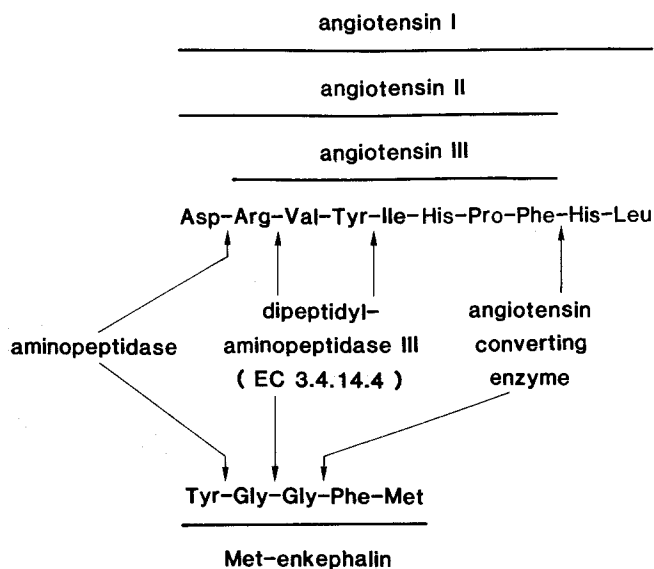


図 21. Angiotensin と Met-enkephalin の転換,
分解酵素の共通性

えられる。しかし, morphine の鎮痛作用発現における ACh の役割は, 今後追究すべき課題である。

生体内, ことに脳内における angiotensin 系とオピオイド系の関係は, 今後, 本研究によって示された angiotensin の抗オピオイド作用という新たな視点により, さらに前進することが期待される。

小 括

1. $[\text{Val}^5]$ -angiotensin I および II は, 脳組織オピオイドレセプターに対する作用を示さなかった。(第 1 章)
2. これらは GPI において, naloxone の約 100 倍強力な抗 Met-enkephalin 活性を示した。(第 2 章-1)
3. GPI において, angiotensin の Ile^5 型と, Val^5 型に効力差のないこと, 並びに活性発現型は angiotensin II であることが示された。(第 2 章-2)

4. GPI において, angiotensin II は angiotensin II レセプターに作用し, ACh ニューロンからの ACh 遊離を促進させることにより, 抗オピオイド作用を示すことが明らかになった。(第2章-3)
5. Angiotensin II はマウス摘出輸精管標本, あるいはウサギ摘出輸精管においても弱い抗オピオイド作用を示した。(第3章)
6. マウス脳室内に投与された angiotensin II は, それ自体では痛覚反応性に影響を及ぼさずに, 同時投与された morphine の鎮痛効果を減弱させることが明らかになった。(第4章)

結 論

著者は、モルモット摘出回腸縦走筋標本における抗 Met-enkephalin 活性を指標にして、ウシ 100 頭分の脳組織から全 10 段階の精製を行い、その中に微量含まれていた 2 つの内在性抗オピオイド物質を単離した。そして各種の同定操作を用いて、これらが angiotensin I および II であることを解明した。

また、これらはオピオイドレセプターには作用しないが、オピオイドレセプターを有する各種摘出末梢組織標本において抗オピオイド作用を示すこと、特に、モルモット摘出回腸縦走筋走本においては ACh 遊離を介する強力な抗オピオイド作用を示すことを明らかにした。さらに、angiotensin II はマウス脳室内投与により、きわめて微量で morphine 鎮痛を減弱させることを明らかにした。

以上の知見より、新たに脳組織より内在性抗オピオイド物質として単離された angiotensin は、生体内において、痛覚制御などのオピオイドの作用を調節する新しい因子として評価できるとの推論に達した。

謝

辞

本研究に際して、終始懇切かつ的確な御指導と御鞭達を賜りました恩師、京都大学薬学部・高木博司教授に心から感謝の意を表します。また、長らく御指導を賜わり、その間多くの有益な御助言をいただいた京都大学薬学部・佐藤公道助教授、倉石 泰博士、植田弘師博士に深く感謝いたします。

また、著者が本研究に着手するきっかけを与えていただいた現福山大学薬学部・塩見浩人教授、精製に関する基礎技術の習得を御指導いただいた現岐阜薬科大学・林 恭三教授、アミノ酸分析に御尽力いただいた国立武蔵療養所・古川昭栄博士に深く感謝いたします。

さらに、本研究にさまざまな方面から御協力いただいた天野博夫博士、中村明弘氏、安居 充氏、松岡信也氏、近藤由佳氏、谷口聖子氏、また、共同研究者として終始熱心に協力していただいた田村滋規、森 明久、両氏に深く感謝いたします。

1985年2月4日

京都大学 薬学部 薬理学教室にて

金子周司

引 用 文 献

- Amano, H., Morimoto, Y., Kaneko, S. and Takagi, H. (1984) *Neuropharmacology* **23**, 395–400.
- Bhargava, H. N. (1981) *Brit. J. Pharmacol.* **72**, 707–714.
- Catt, K. J., Cain, M. C. and Coghlan, J. P. (1967) *Lancet* **2**, 1005–1007.
- Elie, R. and Panisset, J.-C. (1970) *Brain Res.* **17**, 297–305.
- Elliott, D. F. and Peart, W. S. (1956) *Nature* **177**, 527–529.
- Faris, P. L., Komisaruk, B. R., Watkins, L. R. and Mayer, D. J. (1983) *Science* **219**, 310–312.
- Faris, P. L., McLaughlin, C. L., Balie, C. A., Olney, J. W. and Komisaruk, B. R. (1984) *Science* **226**, 1215–1217.
- Fukui, K., Takagi, H., Hayashi, K., Kiso, Y. and Kitagawa, K. (1983) *Neuropharmacology* **22**, 191–196.
- Ganten, D., Lang, R. F., Lehmann, E. and Ungar, T. (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3523–3528.
- Geary, L. E., Wiley, K. S., Scott, W. L. and Cohen, M. L. (1982) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, 104–111.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M. and Wood, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6666–6670.
- Goldstein, C. and Snyder, S. H. (1979) *Life Sci.* **25**, 2065–2070.
- Gray, W. R. (1972) *Methods in Enzymology* Vol. 25 (Academic Press) pp. 121–138.
- Haley, T. J. and McCormick, W. G. (1957) *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 12–15.
- Hammonds, R. G., Nicolas, Jr. P. and Li, C. H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1389–1390.
- Han, J., Tang, J., Huang, B., Liang, X. and Zhang, N. (1979) *Chin. Med. J.* **92**, 625–627.
- Henderson, G., Hughes, J. and Kosterlitz, H. W. (1972) *Brit. J. Pharmacol.* **46**, 764–766.
- Ho, W. K. K., Cox, B. M., Chavkin, C. and Goldstein, A. (1980) *Neuropeptides* **1**, 143–152.

- Hughes, J. (1975) *Brain Res.* **88**, 295–308.
- Itoh, S., Katsuura, G. and Maeda, Y. (1982) *Eur. J. Pharmacol.* **80**, 421–425.
- Jhamandas, K. and Satak, M. (1974) *Brit. J. Pharmacol.* **50**, 57–62.
- 金戸 洋 (1981) エンケファリンとエンドルフィン — 痛みの制御をめぐる, 藤村 一, 高木博司 編 (講談社) pp.184–203.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A. and Matsuo, H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 533–540.
- Kastin, A. J., Olson, R. D., Ehrensing, R. H., Berzas, M. C., Schally, A. V. and Coy, D. H. (1979) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **11**, 721–723.
- Khairallah, P. A. and Page, I. (1961) *Amer. J. Physiol.* **200**, 51–54.
- Kosterlitz, H. W., Lydon, R. T. and Watt, A. F. (1970) *Brit. J. Pharmacol.* **39**, 398–413.
- Leander, S., Håkanson, R., Rosell, S., Folkers, K., Sundler, F. and Tornqvist, K. (1981) *Nature* **294**, 467–469.
- Lee, C.-M. and Snyder, S. H. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12043–12050.
- Lee, N. M., Friedman, H. J., Leybin, L., Cho, T. M., Loh, H. H. and Li, C. H. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5525–5526.
- Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. and Kosterlitz, H. W. (1977) *Nature* **267**, 495–499.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Maganani, M., Mantovani, P. and Pepeu, G. (1984) *Neuropharmacology* **23**, 1305–1309.
- 松尾寿之と寒川賢治 (1984) タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー (化学同人) pp. 77–89.
- Meek, J. L., Yang, H.-Y. T. and Costa, E. (1977) *Neuropharmacology* **16**, 151–154.
- Oka, T., Negishi, K., Suda, M., Matsumiya, T., Inazu, T. and Ueki, M. (1981) *Eur. J. Pharmacol.* **73**, 235–236.
- 奥山典生と笠川 立 (1981) バイオメディカルクロマトグラフィー第2集 (南江堂) pp. 57–77.
- Paton, W. D. M. (1957) *Brit. J. Pharmacol.* **11**, 119–127.
- Printz, M. P., Ganten, D., Ungar, T. and Phillips, M. I. (1982) *The Renin-Angiotensin System in the Brain* (Springer-Verlag) pp. 3–52.

- Regoli, D., Park, W. K. and Rioux, F. (1974) *Pharmacol. Rev.* **26**, 69–123.
- 佐藤公道 (1981) エンケファリンとエンドルフィン — 痛みの制御をめぐる, 藤村 一, 高木博司 編 (講談社) pp. 110–133.
- Schild, H. O. (1957) *Pharmacol. Rev.* **9**, 242–246.
- Semple, P. F., Boyd, A. S., Dawes, P. M. and Morton, J. J. (1976) *Circ. Res.* **39**, 671–678.
- Shelling, P., Hutchinson, J. S., Ganten, U., Sponer, G. and Ganten, D. (1976) *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**, 339s–402s.
- Simonnet, G., Carayon, A., Alard, M., Cesselin, F. and Lagoguey, A. (1984) *Brain Res.* **304**, 93–103.
- Slater, P. and Dickinson, S. L. (1981) *J. Pharm. Pharmacol.* **34**, 113–115.
- Smock, T. and Fields, H. L. (1981) *Brain Res.* **212**, 202–206.
- Summy-Long, J. Y., Keil, L. C., Deen, K., Rosella, L. and Severs, W. B. (1981) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217**, 619–629.
- Summy-Long, J. Y., Keil, L. C., Sells, G., Kirby, A., Chee, O. and Severs, W. B. (1983) *Amer. J. Physiol.* **244**, R522–R529.
- Székely, J. I., Migléc, E., Dunai-Kovács, Z., Tarnawa, I., Rónai, A. Z., Gráf, L. and Bajusz, S. (1979) *Life Sci.* **24**, 1931–1938.
- 橘 真郎 (1981) 蛋白質・核酸・酵素 **26**, 115–124.
- Takagi, H., Inukai, T. and Nakama, M. (1966) *Jap. J. Pharmacol.* **16**, 287–294.
- Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. and Amano, H. (1979) *Nature* **282**, 410–412.
- Tang, J., Chou, J., Iadarola, M., Yang, H. -Y. T. and Costa, E. (1984) *Neuropharmacology* **23**, 715–718.
- Terenius, L. (1975) *J. Pharm. Pharmacol.* **27**, 450–452.
- Ungar, G., Ungar, A. L., Malin, D. H. and Sarantakis, D. (1977) *Psychoneuroendocrinology* **2**, 1–10.
- van Ree, J. M. and de Wied, D. (1976) *Life Sci.* **19**, 1331–1340.
- Wahlström, A. and Terenius, L. (1980) *Acta Physiol. Scand.* **110**, 427–429.
- Walter, R., Ritzmann, R. F., Bhargava, H. N. and Flexner, L. B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 518–520.
- Wilkinson, J. M. (1978) *J. Chromato. Sci.* **16**, 547–552.
- Yang, H. -Y. T. and Neef, N. H. (1972) *J. Neurochem.* **19**, 2443–2450.
- Zetler, G. (1979) *Eur. J. Pharmacol.* **60**, 67–77.